

M15(pREP4) Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT# : EC1090)

M15(pREP4) Competent Cell	100μl /支
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80°C (6个月)

● 基因型

F-, $\Phi 80\Delta lacM15$, *thi*, *lac*-, *mtl*-, *recA*+, *KmR*

● 产品说明

M15(pREP4)蛋白表达菌株含有 pREP4 质粒, 该质粒通过 p15A 复制子启动复制, 可以与许多原核表达质粒共存于同一大肠杆菌细胞中; 同时该质粒携带 *lac I* 基因, 可高效表达 *lac* 抑制蛋白, 在 IPTG 诱导前可抑制目标蛋白的本底表达, 特别适合毒性基因的表达。M15(pREP4)菌株是 PQE 系列质粒的配套菌株, 特别适合 PQE 系列质粒或由 *E.coli* T5 启动子诱导表达的质粒的蛋白表达。pREP4 质粒赋予该菌株卡那霉素抗性。唯地生物生产的 M15(pREP4)感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 > 2 × 10⁸ cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. M15(pREP4)感受态细胞从-80°C拿出, 迅速插入冰中, 5 分钟后待菌块融化, 加入目的质粒, 并用手拨打 EP 管底混匀, 冰中静置 25 分钟。
2. 42°C水浴热激 45 秒, 迅速放回冰上并静置 2 分钟, 晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 700 μl 不含抗生素的无菌培养基 (LB), 混匀后 37°C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心一分钟收菌, 留取 50 μl 左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含 35 μg/ml 卡那霉素及所选质粒筛选抗生素的 LB 培养基上 (若质粒浓度较高, 也可稀释后涂板, 务必保证能在平板上挑到单克隆菌落)。
5. 将平板倒置放于 37°C培养箱过夜培养, M15(pREP4)菌株在平板或液体培养基中生长时, 需在培养基中加入终浓度为 35ug/ml 的卡那霉素。

● 蛋白小量诱导表达 Protocol (for reference only)

1. 小摇接菌：在透气试管或透气离心管中准备 1-3ml 含相应抗生素的液体 LB（或 2YT、TB、SB 等营养丰富培养基），接入一个含有目的质粒的新鲜单菌落。
2. 37°C，200 rpm 过夜摇菌约 10-15h。
3. 大摇接菌：将第一步的小摇菌液按 1-2%比例接菌到 50ml 含相应抗生素的 LB（或 2YT、TB、SB 等营养丰富培养基），为增加溶氧，最好使用 500ml 三角瓶（加入营养液的体积一般为三角瓶标定体积的 1/10，最高不超过 1/5）。
4. 37°C，150 rpm 摇菌到 OD600 值为 0.5-0.8（一般需要 2-4h）。
5. 空白对照取样（可选步骤）：在加入诱导剂 IPTG 前可取样 1ml 菌液到 1.5ml 离心管中，12000rpm 离心 10 分钟，弃上清，沉淀放-20°C保存待用。
6. 第四步的三角瓶中加入 IPTG 至终浓度为 1mM（IPTG 浓度可自由调整），继续 37°C，120 rpm 摇菌 2-4h。
7. 不同时间点取样（可选步骤）：最佳摇菌时间与所表达蛋白有关，表达蛋白不同最佳摇菌时间不同，为找到最佳诱导时间可在不同诱导时间点取样（例：在诱导第 2h，4h，6h，8h，14h 取样，离心后放-20°C保存）。
8. 离心收菌：三角瓶从摇床拿出，埋入冰中 10 分钟，4°C，5000g，10 分钟离心，弃上清，沉淀保存在-20°C。
9. 待所有样品准备妥当，可以做 SDS-PAGE 分析蛋白表达。

● 1 M IPTG 溶液配制（唯地 CAT#: YC8022）：

- 2.38 g IPTG 加入无菌的双蒸水 10 mL，完全溶解后用 0.22um 的滤膜过滤除菌。

● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰中缓慢融化，插入冰中 8 分钟内加入目标 DNA，不可在冰中放置时间过长，长时间存放会降低转化效率。
2. M15(pREP4)菌株在平板或液体培养基中生长时，需在培养基中加入终浓度为 35ug/ml 的卡那霉素。
3. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
4. 为获得需要量的蛋白，最佳诱导时间，温度，IPTG 浓度需实验者优化。